



# Influência da cafeína sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae), com diferentes idades

Paula Ferreira<sup>1</sup>; Geraldo L G. Soares<sup>2</sup>; Sthefane D'ávila<sup>3</sup> & Elisabeth Cristina de Almeida Bessa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia de Moluscos e Helminthos, Pós-graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

<sup>2</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>3</sup>Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

**Abstract. Caffeine influence upon survival, growth and reproduction of *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) by considering different ages.** *Bradybaena similaris* is a terrestrial snail cited in literature as intermediate host of animals and agricultural plagues. It has a very difficult control which generates vast damage in agriculture and ornamental cultivation. The objective of this work was to evaluate the influence of caffeine in different concentrations (2,5g/L and 5g/L) on the nestlings eclosion, survival after eclosion, growth and reproduction of *B. similaris* under laboratory conditions. It was tested 120 eggs and 120 young between 10 and 30 days of age. Results had shown that caffeine 2,5g/L and 5g/L presented no effects in young eclosions. Caffeine 5g/L generated 65% of mortality in young of 10 days of age and 50% in young of 30 days of age. The results were not significant for growth and reproduction. However, it suggests new studies with larger concentrations.

**Key words:** *Bradybaena similaris*, control, biology, caffeine, molluscicide

**Resumo.** *Bradybaena similaris* é uma espécie de molusco terrestre citada na literatura como hospedeiro intermediário de parasitos de animais. Também atua como praga agrícola, de difícil controle, causando grandes prejuízos a lavouras e cultivo de plantas ornamentais. O objetivo deste trabalho foi avaliar, durante 120 dias, o efeito da cafeína, em diferentes concentrações (2,5g/L e 5g/L), sobre a eclodibilidade dos filhotes, a sobrevivência após a eclosão, crescimento e a reprodução de *B. similaris* em condições de laboratório. Foram testados 120 ovos e 120 jovens com 10 e 30 dias de vida. Os resultados dos testes mostraram que a cafeína (5g/L e 2,5g/L) não influenciou a eclodibilidade dos jovens. A cafeína à 5g/L provocou uma mortalidade de 65% quando aplicada em jovens com 10 dias de vida e de 50% em jovens com 30 dias de vida. Com relação ao crescimento e a reprodução, os resultados foram não significativos. Os resultados deste trabalho sugerem novos estudos utilizando-se concentrações maiores.

**Palavras-chave:** *Bradybaena similaris*, controle, biologia, cafeína, moluscicida

## INTRODUÇÃO

*Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) é um molusco terrestre, originário da China, amplamente distribuído na natureza, principalmente em regiões tropicais. É considerada praga agrícola pela sua preferência por plantas de consumo humano (LEAHY, 1980). Também pode atuar como

hospedeiro intermediário de parasitos como *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923 (Digenea, Brachylaimidae) (DUARTE, 1980; AMATO & BEZERRA, 1989), *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971 (Nematoda, Angiostrongylidae) (RAMBO, AGOSTINI & GRAFF-TEIXEIRA, 1997), *A. cantonensis* (Nematoda, Angiostrongylidae) (JAUME, PUGA & AGUIAR, 1981), *Eurytrema coelomaticum* Giard & Billet, 1882

(Digenea, Dicrocoeliidae) (PINHEIRO & AMATO, 1995). É uma espécie resistente às variações das condições ambientais, apresenta capacidade de estivação durante condições desfavoráveis de temperatura e umidade, colonizando novamente o local, quando as condições se tornam favoráveis (LEAHY, 1984).

O uso de produtos químicos sintéticos no controle de moluscos é de custo elevado e perigoso, já que as substâncias utilizadas também são tóxicas para vários organismos. Por isso, o uso de substâncias moluscidas de origem vegetal que sejam seletivas e que possam ser utilizadas de forma controlada e padronizada, pode representar uma forma segura de controle desses animais. A cafeína é um metabólito secundário nitrogenado presente em diversas espécies de vegetais como, *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae), *Coffea arabica* L. (Rubiaceae), *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) e *Paullinia cupana* Kunth. (Sapindaceae) (BRENELLI, 2003). O potencial moluscida e fago-inibidor dessa substância foi verificado por HOLLINGSWORTH *et al.* (2002), no controle de moluscos da espécie *Verocinella cubensis* (Pfeifer, 1840) (Veronicellidae) utilizando as concentrações de 1 a 2%.

No Brasil são poucos os trabalhos com substâncias moluscidas de origem vegetal no controle de moluscos terrestres. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da cafeína sobre o desenvolvimento dos ovos, a sobrevivência, crescimento e reprodução de jovens com 10 e 30 dias de idade de *B. similaris*, durante 120 dias, em condições de laboratório.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biologia de Moluscos e Helminthos do curso

de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Mestrado em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora – Juiz de Fora, Minas Gerais. Foi estabelecida uma criação, com moluscos, que apresentavam a mesma idade, a qual serviu como fonte para obtenção de todos os ovos e indivíduos utilizados neste trabalho.

Foram utilizados 120 ovos de *B. similaris* e 120 jovens com 10, 30 e 120 dias de idade os moluscos foram distribuídos ao acaso, em grupos de 10 indivíduos e mantidos em terrários de duas maneiras: os ovos foram colocados em terrários com 9 cm de diâmetro e 6,2 cm de profundidade, e os jovens com 10 e 30 dias de idade foram colocados em terrários com 12 cm de diâmetro e 9 cm de profundidade, contendo terra vegetal previamente esterilizada (120°C/1h.) e fechados com tecido de algodão escalline. As observações foram realizadas ao longo de 120 dias.

Deste total, 40 ovos e 40 jovens com 10 dias e 30 dias de idade foram destinados ao teste com a solução de cafeína a 2,5g/L. A mesma quantidade de ovos e jovens com 10 e 30 dias foi utilizada para as concentrações de cafeína à 5g/L, e para o grupo controle.

Os moluscos foram alimentados com ração para aves de corte-inicial (composição básica: proteína bruta 22%, extrato etéreo 2,6%, matéria fibrosa 6,5%, matéria mineral 9,0%, cálcio 1,50%, fósforo 0,50%) peneirada em peneira de 1mm de malha, enriquecida com carbonato de cálcio (na proporção 3:1) (BESSA & ARAÚJO, 1995). Os terrários foram umedecidos com água, a cada três dias, sendo também renovado o alimento dos moluscos.

Foram observados diariamente os valores de temperatura mínima e máxima e umidade relativa

do ar, utilizando para tal, um termômetro e termohigrômetro (Incoterm<sup>®</sup>). A cafeína (Nuclear<sup>®</sup>) foi diluída em água destilada aquecida a 40 °C sob agitação constante.

### **Experimento I – Avaliação da Influência da cafeína na eclosão de jovens provenientes de ovos tratados.**

Para realização dos testes, os ovos foram colocados, em grupos de 10, em recipiente plástico com 5 cm de diâmetro e 4 cm de profundidade contendo 5ml das soluções (cafeína 2,5g/L, cafeína 5g/L), durante 10 minutos (SOUZA, 2003). Os ovos do grupo receberam água potável. Após este período, os ovos foram retirados e devolvidos aos seus respectivos terrários.

Para avaliação da eclosão foram feitas observações diárias durante 20 dias. Os jovens eclodidos foram mantidos em seus terrários por 20 dias. Os moluscos sobreviventes até então, foram utilizados nos experimentos que se seguem:

### **Experimento II – Avaliação da sobrevivência, crescimento e da reprodução de jovens eclodidos de ovos de tratados com diferentes concentrações de cafeína.**

Durante 120 dias, foram feitas observações sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução, dos jovens eclodidos de ovos tratados com cafeína (2,5g/L, 5g/L). Os jovens foram mantidos em seus terrários durante todo o experimento.

O crescimento dos indivíduos de todos os grupos tratados e controle foi avaliado através de medições quinzenais (até o 120º dia de vida), com o auxílio de um paquímetro Kanon (Mardened Stainless 1/28 in 1/20 mm). Também foi avaliado o tempo para o alcance da maturidade sexual. O parâmetro

utilizado para o alcance da maturidade sexual em *B. similaris* foi a presença de ovos nos terrários. Foram contabilizados 20 ovos de cada evento reprodutivo, até a quarta postura, e a partir daí, a média de eclosão foi avaliada.

### **Experimento III - Influência da cafeína na sobrevivência, crescimento e reprodução de jovens com 10 e 30 dias de idade.**

Para realização dos testes os jovens com 10 e 30 dias de idade foram deixados por um período em jejum de 24 horas SOUZA (2003). Após este prazo, foram distribuídos em grupos de 10, em recipientes plásticos, contendo 5 cm de diâmetro e 4 cm de profundidade contendo 5ml de cafeína nas concentrações 2,5g/L e 5g/L, onde permaneceram por durante 10 minutos, o grupo controle recebeu água potável. Após este período, os jovens foram retirados e devolvidos aos seus respectivos terrários.

A sobrevivência, o crescimento e a reprodução foram verificados durante 120 dias. O crescimento dos indivíduos dos grupos tratado e controle foram avaliados através de medições quinzenais (até o 120º dia de vida). Para a análise estatística dos dados, de todos os experimentos, foi utilizado o teste de análise de variância (one way ANOVA), com intervalo de confiança de 95%, seguido do teste Tukey-Kramer e também o test “t” Student.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Experimento I – Avaliação da Influência da cafeína sobre a eclosão de jovens provenientes de ovos tratados.**

A cafeína nas concentrações de 5 e 2,5g/L não apresentou atividade ovicida, não influenciando a eclosão dos jovens. O percentual de eclosão do

grupo tratado com cafeína a 5g/L foi de 47,5%, de cafeína a 2,5g/L 57,5% e do grupo controle 67,5%. O teste ANOVA ( $P < 0,05$ ;  $p = 0,5$ ) mostrou não ser significativa a diferença entre as médias de eclosão dos jovens dos grupos tratado e controle. Porém, houve uma diferença de eclosão de 20% entre o grupo controle e a cafeína a 5g/L, sugerindo a utilização de concentrações maiores para que se alcance um percentual maior de mortalidade dos ovos.

Segundo SOUZA *et al.* (1987) que trabalharam com atividade moluscicida do extrato butílico de *Phytolacca dodecandra* L., em *B. glabrata*, constataram que a concentração necessária para se atingir a  $CL_{90}$  sobre as desovas foi 22 vezes maior que a concentração da  $CL_{90}$  dos moluscos adultos. Tanto os resultados de SOUZA *et al.* (1984, 1987), quanto os obtidos neste trabalho indicam uma resistência maior dos ovos, muito provavelmente por estarem protegidos por uma casca membranosa.

### Experimento II – Avaliação da sobrevivência, crescimento e reprodução de *Bradybaena similaris*, eclodida de ovos tratados, com diferentes concentrações de cafeína.

A cafeína influenciou a sobrevivência dos moluscos ao longo de 120 dias, tratados na idade de ovo. A sobrevivência dos moluscos tratados com cafeína a 5g/L foi menor, sugerindo presença de efeito residual para essa espécie de molusco.

O teste ANOVA ( $p < 0,0001$ ) mostrou ser extremamente significativa as diferenças entre as médias de sobrevivência dos grupos tratado e controle (Tab.1) O Teste de Tukey-Kramer mostrou ser significativa a diferença entre as médias dos moluscos do grupo tratado com cafeína a 5g/L e o controle ( $p < 0,001$ ) e entre moluscos tratados com cafeína à 5g/L e 2,5g/L ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 1.** Sobrevivência de jovens de *Bradybaena similaris* eclodidos de ovos tratados com cafeína, em diferentes concentrações, observados 120 dias pós-eclosão.

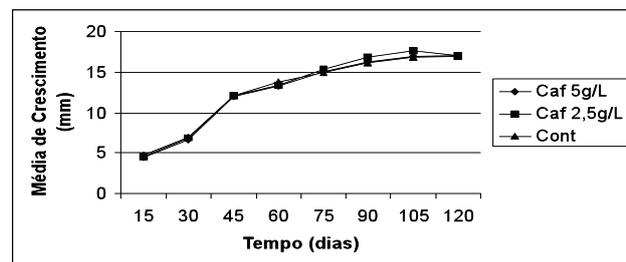
Concentração	média	desvio padrão	sobrevivência (%)
Cafeína 5g/l	3,89 <sup>a</sup>	0,33	37,5
Cafeína 2,5g/l	6,0 <sup>b</sup>	0	60
Controle	6,5 <sup>b</sup>	0,09	65

\*Valores com letras diferentes apresentam diferença significativa.

A cafeína não apresentou efeito sobre o crescimento dos jovens eclodidos de ovos tratados ( $p = 0,99$ ) (Fig. 1).

Com relação ao alcance da maturidade sexual, que ocorreu ao 105º dia, não houve diferença significativa entre os grupos tratados e controle, uma vez que o intervalo de tempo máximo foi de três dias. Neste período, os indivíduos tratados com cafeína (5g/L) apresentavam um diâmetro médio da concha de 16,8 mm, os tratados com cafeína (2,5g/L) o diâmetro médio era de 17,6 mm e o do grupo controle o diâmetro médio era de 16,8 mm.

Não houve diferença significativa entre as médias de eclosões de jovens em ovos de *B. similaris* eclodida de ovos tratados.



**Figura 1.** Médias quinzenais do diâmetro da concha de *Bradybaena similaris* eclodida de ovos tratados com cafeína, observada durante 120 dias após o tratamento.

### Experimento III - Influência da cafeína na sobrevivência, crescimento e reprodução de jovens com 10 e 30 dias de idade.

#### **Jovens com 10 dias de idade tratados com cafeína**

A cafeína atuou como moluscicida a 5g/L, com percentual de mortalidade de 65% para os jovens com 10 dias de vida. O teste ANOVA ( $p < 0,001$ ) mostrou ser significativa a diferença entre as médias dos indivíduos tratados com cafeína a 5g/L e os tratados a 2,5g/L bem como as do grupo controle durante as primeiras 72 horas (Tab. 2). O Teste de Tukey-Kramer mostrou ser significativa a diferença entre as médias de sobrevivência dos moluscos do grupo tratado com cafeína à 5g/L e o grupo controle ( $p < 0,001$ ); entre tratado com cafeína à 5g/L e a 2,5g/L ( $p < 0,001$ ) e entre o grupo controle e os moluscos tratados com cafeína a 2,5g/L não houve significância.

**Tabela 2.** Sobrevivência de jovens de *Bradybaena similaris* com 10 dias de idade tratados com cafeína, após 72 horas de observação.

Concentração	média	desvio padrão	sobrevivência (%)
Cafeína 5g/L	3,5 <sup>a</sup>	1,7	35
Cafeína 2,5g/L	8,5 <sup>b</sup>	1,2	85
Controle	10 <sup>b</sup>	0	100

\*Valores com letras diferentes apresentam diferença significativa.

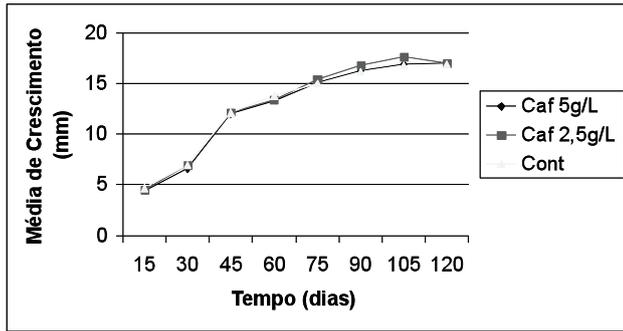
A avaliação da atividade moluscicida de uma substância sobre indivíduos jovens é muito importante, pois contribui para confirmação da eficácia da substância. Grande parte dos trabalhos é realizada com moluscos adultos ou desovas deixando de ser avaliado a suscetibilidade dos jovens. SOUZA *et al.* (1987) verificou que a concentração do extrato butírico de *P. dodecandra* utilizada para atingir a  $CL_{90}$  dos jovens foi cinco vezes maior que a dos adultos de *B. glabrata*. O que mostra que essa substância em

concentrações baixas pode apresentar efeito moluscicida sobre moluscos jovens.

Durante o acompanhamento do experimento ao longo dos 120 dias, verificou-se que não ocorreu mais nenhuma morte, em nenhum dos grupos. Isto demonstra a inexistência de efeito residual, em moluscos de *B. similaris* tratados com esta idade, nessas concentrações de cafeína.

Neste experimento não foi observado o comportamento de fuga dos jovens quando em contato com nenhuma das concentrações de cafeína, mostrando que esta substância não é repelente para esta espécie. Um dos comportamentos exibidos por *B. similaris* que pode favorecer a sobrevivência à ação de moluscicidas é a resposta rápida de fuga em deslocamento vertical. REY (1973) verificou que uma das restrições ao uso do pentaclorofenato de sódio, em campanhas de controle de moluscos, está na sua "ação irritativa" fazendo-os abandonar a água quando aplicados em altas doses. Desta forma, a ação repelente de uma substância pode torná-la ineficaz. SOUZA (2003) testou a atividade moluscicida da cafeína, à 3g/L sobre adultos de *B. similaris* e verificou que em 24 horas de observação o percentual de mortalidade foi de 87%. HOLLINGSWORTH *et al.* (2002) verificaram a atividade moluscicida e de repelência da cafeína sobre outro molusco terrestre, *V. cubensis*, este autor utilizou a cafeína no solo a 2%, o que corresponde a 20g/L, e obteve um percentual de mortalidade de 92% após 48 horas de exposição.

A cafeína não apresentou efeito sobre o crescimento dos moluscos tratados com 10 dias de vida. O teste ANOVA ( $p = 0,99$ ), mostrou não ser significativa a diferença entre as médias dos grupos tratados e controle (Fig. 2).



**Figura 2.** Médias quinzenais do diâmetro da concha de *Bradybaena similaris*, tratada com cafeína, aos 10 dias de idade observada durante 120 dias após o tratamento.

Com relação ao alcance da maturidade sexual, que ocorreu ao 105º dia, não houve diferença significativa entre os grupos tratados e controle, uma vez que o espaço de tempo máximo foi de três dias. Neste período, os indivíduos tratados com cafeína (5g/L) apresentavam um diâmetro médio da concha de 15,3 mm, os tratados com cafeína (2,5g/L) o diâmetro médio foi de 15,5 mm e o do grupo controle o diâmetro médio era de 15,3 mm. Também não houve efeito significativo sobre a produção de filhotes dos jovens tratados.

#### **Jovens de 30 dias de idade tratados com cafeína**

A cafeína a 5g/L atuou como moluscicida para os jovens de 30 dias de vida, causando uma mortalidade de 50%. O teste ANOVA ( $p=0,01$ ) mostrou ser significativa a diferença entre as médias de sobrevivência dos indivíduos tratados com cafeína a 5g/L e os tratados a 2,5g/L bem como os do grupo controle durante as primeiras 72 horas (Tab. 3).

O teste estatístico Tukey-Kramer mostrou ser significativa a diferença entre as médias de sobrevivência dos moluscos do grupo tratado com cafeína à 5g/L e o grupo controle ( $p<0,05$ ); entre a cafeína à 5g/L e à 2,5g/L ( $p<0,05$ ) e entre o grupo controle e os moluscos tratados com cafeína à 2,5g/L não

**Tabela 3.** Sobrevivência de *Bradybaena similaris* tratada com cafeína aos 30 dias de idade, observada durante 72 horas após o tratamento.

Concentração	média	desvio padrão	sobrevivência (%)
<b>Cafeína 5g/L</b>	5 <sup>a</sup>	2,9	50
<b>Cafeína 2,5g/L</b>	8,75 <sup>b</sup>	0,5	87,5
<b>Controle</b>	10 <sup>b</sup>	0	100

\*Valores com letras diferentes apresentam diferença significativa.

houve significância. Nenhuma morte foi verificada após 72 horas até o final do experimento ao longo dos 120 dias.

Não houve influência da cafeína no crescimento dos moluscos tratados com 30 dias. O teste ANOVA ( $p=0,83$ ), mostrou não ser significativa a diferença entre as médias dos grupos tratados e controle. Também não houve diferença significativa com relação ao alcance da maturidade sexual, que ocorreu no 105º dia, nem mesmo no número de jovens produzidos por *B. similaris*, tratadas com cafeína, com 30 dias de idade nas concentrações à 5g/L, a 2,5g/L e o grupo controle.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem novos estudos com a cafeína em concentrações maiores para verificação da ação sobre os ovos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AMATO, S.B. & BEZERRA, J.C.B. 1989. Parasitismo Natural de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) por *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1983. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 84 (1): 75-79.
- BESSA, E.C.A. & ARAÚJO, J.L.B. 1995. Oviposição, tamanho de ovos e medida do comprimento da concha em diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Brugüère, 1789) (Pulomonata, Subulinidae) em condições de Laboratório. **Revista Brasileira de**

- Zoologia 12** (3): 647-654.
- BRENELLI, E.C.S. 2003. A extração de cafeína em bebidas estimulantes - uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química Nova 26** (1): 136-138.
- DUARTE, M.J.F. 1980. O ciclo evolutivo de *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Trematoda, Brachylaemidae). **Revista Brasileira de Biologia 40** (4): 783-809.
- HOLLINGSWORTH, R.G.; ARMSTRONG, J.W.; CAMPBELL, E. 2002. Caffeine as a repellent for slugs and snails. **Nature 417**: 915-916.
- JAUME, M.L.; PUGA, G.P. & AGUIAR, P.H. 1981. *Bradybaena similis* (Férussac): hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus cantonensis* em Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical 33**: 207-209.
- LEAHY, W. 1980. Aspectos adaptativos de *Bradybaena similis* Ferussac, 1821 (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) submetido ao jejum e dessecação. **Boletim de Fisiologia Animal 5**: 47-55.
- LEAHY, W. 1984. Comportamento e características anatomofuncionais da reprodução em *Bradybaena similis* (Molusco pulmonado). **Ciência e Cultura 36** (98): 1389-1392.
- PIERI, O. & JURBERG, P. 1981. Aspectos etológicos na sobrevivência dos caramujos vetores da xistosomose ao tratamento com moluscicidas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 76** (1): 47-55.
- PINHEIRO, J. & AMATO, S.B. 1995. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similis* (Gastropoda, Xanthonychidae). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz 89** (3): 407-410.
- RAMBO, P.R.; AGOSTINI, A.A. & GRAFF-TEIXEIRA, C. 1997. Abdominal angiostrongylosis in Southern Brazil – prevalence and parasitic burden in mollusk intermediate hosts from eighteen endemic foci. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 92** (1): 9-14.
- REY, I. 1973. **Parasitologia**. Rio de Janeiro, Brasil, Guanabara Koogan, 695p.
- SOUZA, H.E. 2003. **Atividade moluscicida e fagoinibidora da cafeína e do timol sobre três espécies de moluscos gastrópodes terrestres em condições de laboratório**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. 45p.
- SOUZA, C.P.; MENDES, N.M.; ARAÚJO, N. & KATZ, N. 1987. Atividade moluscicida do extrato butílico de *Phytolaca dodecandra* sobre *Biomphalaria glabrata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 82**: 345-359

Recebido: 10/09/2008

Revisado: 08/07/2009

Aceito: 28/06/2010

